

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12524

研究課題名(和文) 熱パルスによる心疾患治療デバイスの基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of basic technologies for the treatment of heart disease by infra-red laser irradiation.

研究代表者

小比類巻 生 (Kobirumaki-Shimozawa, Fuyu)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40548905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において申請者らは、マウス *in vivo* 左心室心筋細胞におけるサルコメア長と細胞内Ca濃度の同時イメージングを可能にする高時間(100 fps)・空間(20 nm)共焦点顕微鏡システムの構築を行った。イメージング中は、心電図、左心室内圧および左心室の圧容積関係などのマクロパラメーターも同時に計測した。この顕微システムを用い、細胞膜染色試薬を用いて心筋細胞のT管を染色した心臓に赤外レーザーのパルス照射を行うと、心筋細胞の動的特性が亢進した。本研究の結果は、赤外レーザーのパルス照射が *in vivo* における心筋の収縮性を促進させる上で有用であることを示している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we developed a high-speed (100 fps), high-resolution (20 nm) confocal microscopic system enabling simultaneous imaging of sarcomere length (SL) and the intracellular Ca concentration ([Ca]<sub>i</sub>) in left ventricular cardiomyocytes in mice *in vivo*. During imaging, we measured macroscopic parameters such as electrocardiogram, left ventricular pressure and the left ventricular pressure-volume relationship, simultaneous with SL and [Ca]<sub>i</sub>. By using this system, we investigated the effects of pulsed infra-red laser irradiation on cardiomyocytes labeled for the T-tubules, and found that myocyte contractions were enhanced. These findings indicate that infra-red laser irradiation is useful in promoting myocardial contraction *in vivo*.

研究分野：生物物理学

キーワード：熱パルス *in vivo*イメージング サルコメア

### 1. 研究開始当初の背景

1) 我が国における心疾患の死亡率は非常に高く、現在、癌に次いで第二位となっており、患者数も年々増加している。多くの心疾患は進行性であり、心機能の低下を経て最終的に心不全等の転帰をとることが多い。このため、患者の QOL 改善と延命のためには、疾患超早期の段階で心機能の低下を抑制することが肝要である。しかしながら、臨床で現在使用されている強心薬やペースメーカーは心筋細胞の膜電位や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態に直接的な影響を与えるため、致死的不整脈を惹起する危険と常に隣り合わせであるという大きな欠点がある。

2) 申請者らは、申請当時、心筋細胞に近赤外 (IR) レーザーパルス照射すると、照射中に心筋細胞が収縮する現象を既に発見していた。この心筋細胞の収縮現象は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇を伴わず、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存的な収縮であること、さらに収縮に必要な温度は  $37\sim 42^\circ\text{C}$  と十分に生体応用が可能な範囲であることを確認していた (Oyama et al. *BBRC* 2012)。

### 2. 研究の目的

1) 本研究では、従来にない全く新しい心機能改善法として、「局所熱パルス照射」による心筋収縮力増強を提案した。すなわち、マウス *in vivo* 心臓の局所に赤外レーザーを照射することによって心筋収縮構造 (サルコメア) の収縮・弛緩を直接的に制御し、効率的で、かつ安全性の高い、革新的な次世代心疾患治療デバイスの基盤技術を開発に挑戦した。

2) 上記デバイス開発に必要な基礎的情報を収集するため、マウスを用いて局所熱パルスによる心筋細胞収縮が生体の心臓に対してどのような効果をもたらすかを調査する必要があった。この効果測定にあたり、申請者らは従来から用いられている心電図 (ECG) や圧-容積曲線 (P-V ループ) などのマクロ情報に加えて、心筋細胞内のサルコメアや  $\text{Ca}^{2+}$  の動態をナノメーター精度で測定することにより分子レベルで定量的に解析することを目指した。

### 3. 研究の方法

1) 顕微鏡の構築：熱パルス照射と同時にサルコメア長 (SL) および  $\text{Ca}^{2+}$  の高速ライブイメージングを行うため、顕微鏡システムの改良を行う。これまでに構築した *in vivo* ライブイメージング用共焦点顕微鏡に、Cameleon-nano が持つ 2 つの発色団 (CFP・YFP) の 2 色を同時にイメージング可能な 2 光路系を導入する。この改良により、 $\alpha$ -actinin2-Cameleon-nano によるサルコメア長 (蛍光タンパク質の局在を解析) と  $\text{Ca}^{2+}$  イオン (CFP・YFP の FRET 現象を解析) の同時イメージングが可能な顕微鏡系を構築する。

2) アデノウイルスベクターの作製：顕微鏡システムの開発と並行して、 $\alpha$ -actinin-cameleon-nano を発現する遺伝子を持つ遺伝子組み換えアデノウイルスベクターを作成する。ウイルスの精製には、現在既で使用している  $\alpha$ -actinin-GFP 発現ウイルスと同様に、Microbix 社のウイルス作製キットを利用する。ウイルス粒子を *in vivo* に投与可能な量まで増幅後、マウスへ投与するため精製を行う (終濃度: 約  $5 \times 10^{11}$  particle titer / mL)。

3) 局所熱パルスによる心臓内の心筋加熱収縮：マウス成体から摘出した心臓を大動脈から逆行性に灌流し、赤外光レーザーを照射することによって心臓という臓器レベルにおいて心筋細胞の収縮を誘発できるか否かを検証する。さらに、申請者が独自に開発したサルコメア長・ $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法を使用し、熱パルスに対する心筋細胞の応答を分子レベルで定量的に評価・解析することにより、そのメカニズム解明を試みる。灌流心臓でのデータが集まり解析が進行したら、並行して *in vivo* 正常心臓に応用し、分子レベルとマクロレベルの両面から心臓への熱パルス照射に対する心臓、および個体の応答を検証する。特に分子動態と P-V ループの同時計測により、熱パルス照射に対する分子レベルの応答と心臓の仕事量変化の関係を検討する。

### 4. 研究成果

1) *In vivo* におけるサルコメア長と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度やその他の要素との同時計測を可能にするため、2 光路系を備えたスピニングディスク型高速共焦点顕微鏡系の構築を行った。また、心室圧容積曲線 (p-v ループ) との同時計測を可能にするカテーテル機器を、*in vivo* 顕微鏡システムに導入し、サルコメア長や  $\text{Ca}^{2+}$  濃度などの分子動態と心機能との関係を解析すると同時に生きた心臓に熱パルスを同時照射可能なシステムを構築した (図 1)。

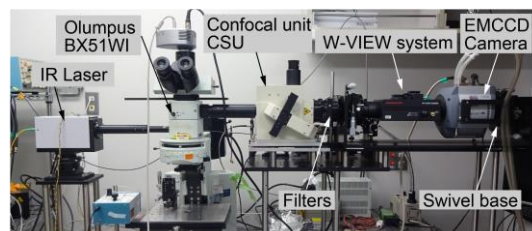


図 1：2 光路系と IR レーザを備えた共焦点蛍光顕微鏡

2) 膜染色試薬を用いて T 管を染色した心臓において、T 管をイメージングしつつ局所熱パルス照射を行った結果、以前に単離心筋細胞で確認されたのと同様に、生きた心臓においても熱パルス照射部位の心筋収縮を惹起できることを確認した。このように本研究によって熱パルスによる心筋細胞制御の可能性が確認された。

3) また熱パルス照射が心筋細胞にどのような影響を与えるか詳細に調べるため、*in vivo* サルコメア・Ca<sup>2+</sup>同時イメージングの前段階として、摘出心臓での Ca<sup>2+</sup>イメージング系を確立し、Ca<sup>2+</sup>ウェーブ発生初期の詳細な解析手法を開発して論文を発表した(図2)。

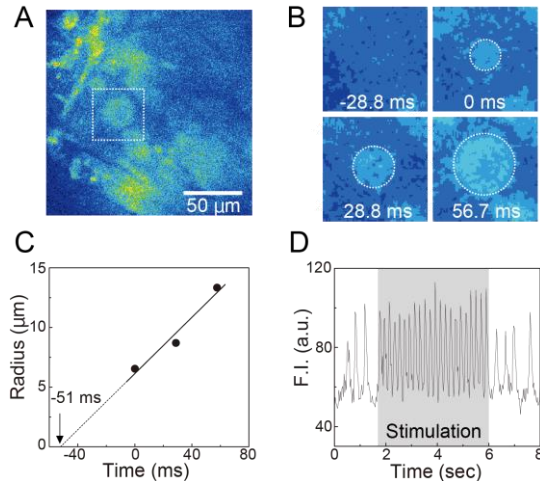


図2: Ca<sup>2+</sup>ウェーブの詳細解析 (A) マウス摘出心臓を Ca<sup>2+</sup>指示薬 Cal-520 を灌流・染色し 100fps で画像取得した。(B) A の白い四角で囲まれた Ca<sup>2+</sup>ウェーブの経時変化。(C) 初期 Ca<sup>2+</sup>ウェーブの直径の時間に伴う拡大とウェーブ発生時間の推定。(D) 自発的 Ca<sup>2+</sup>ウェーブと、電気刺激による Ca<sup>2+</sup>トランジェント(網掛け部分)。

またサルコメアイメージングに適した細胞内構造の蛍光標識手法を確立し、それらをまとめた論文を投稿中である(図3)。さらに拡張型心筋症モデルマウスのサルコメアおよびT管の *in vivo* イメージングを行い、野生型と病態マウスとの違いを解析中であり、今後は熱パルス照射によって病態マウスの心機能を改善することができるかさらに調査していく予定である。

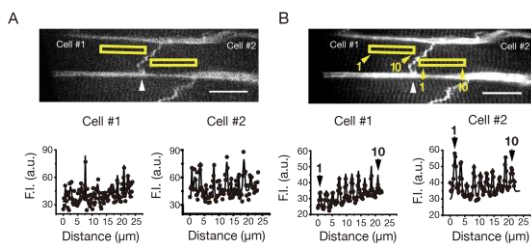


図3: 膜染色試薬による *in vivo* T管観察。(A) CellMaskを用いて心臓表面から滴下染色したマウスT管(露光時間 10ms で撮影)。(B) (A) で撮影した画像を25枚合成したもの.T管間隔を測定できる画質となった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5件)

- ① Kagemoto T, Oyama K, Yamane M, Tsukamoto S, Kobirumaki-Shimozawa F, Li A, dos Remedios C, Fukuda N, Ishiwata S. "Sarcomeric auto-oscillations in single

myofibrils from the heart of patients with dilated cardiomyopathy." *Circulation: Heart Failure* 2018 In press.

- ② Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Shimozawa T, Mizuno A, Ohki T, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata S, Fukuda N. "Nano-imaging of the beating heart *in vivo*: importance of sarcomere dynamics, as opposed to sarcomere length per se, in the regulation of cardiac function." *J Gen. Physiol.* 2016 Jan;147(1):53-62. doi: 10.1085/jgp.201511484.
- ③ Shimozawa T, Hirokawa E (equal first author), Kobirumaki-Shimozawa F (equal first author), Oyama K, Shintani SA, Terui T, Kushida Y, Tsukamoto S, Fujii T, Ishiwata S, Fukuda N. "In vivo cardiac nano-imaging: A new technology for high-precision analysis of sarcomere dynamics in the heart." *Prog Biophys Mol Biol.* 2016 Sep 21. pii: S0079-6107(16)30077-3. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2016.09.006.
- ④ Tsukamoto S, Fujii T, Oyama K, Shintani SA, Shimozawa T, Kobirumaki-Shimozawa F, Ishiwata S, Fukuda N. "Simultaneous imaging of local calcium and single sarcomere length in rat neonatal cardiomyocytes using yellow Cameleon-Nano140." *J Gen Physiol.* 2016 Oct;148(4):341-55. doi: 10.1085/jgp.201611604.
- ⑤ Ishiwata S, Miyazaki M, Sato K, Nakagome K, Shintani SA, Kobirumaki-Shimozawa F, Fukuda N, Suzuki K, Takagi J, Shimamoto Y, Itabashi T. "Dynamic properties of bio-motile systems with a liquid-crystalline structure." *Molecular Crystals and Liquid Crystals.* 2017 647:127-150. doi: 10.1080/15421406.2017.1289445.

[学会発表] (計 7件)

- ① 小比類巻生, 大山廣太郎, 下澤東吾, 新谷正嶺, 広川恵理沙, 照井貴子, 石渡信一, 福田紀男 "ナノイメージングによるマウス心臓の *in vivo* サルコメア動態解析" 第53回日本生物物理学会、金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市)、2015年9月13日
- ② 小比類巻生, 福田紀男 "マウス心臓における興奮収縮連関のナノイメージング" 第94回日本生理学会大会、浜松アクトシティ (静岡県浜松市)、2017年3月28日 シンポジウム「生物物理学的手法による生理学研究の新展開」日本生理学会 入澤宏・彩記念若手奨励賞 (心臓循環分野) 受賞
- ③ 塚本精一, 大山廣太郎, 藤井輝之, 小比類巻生, 石渡信一, 福田紀男 "ラット幼若心筋細胞のZ線における Yellow Cameleon-Nano140 融合  $\alpha$ -actinin 発現を

- 用いたサルコメア動態と局所的カルシウムの同時観測” 第 94 回日本生理学会大会, 浜松, 2017 年, 3 月
- ④ 下澤東吾、広川恵里沙、小比類巻生、大山廣太郎、照井貴子、石渡信一、福田紀男 「*In vivo* 心筋ナノイメージング」生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」生理学研究所（明大寺地区） 2017 年 9 月 14 日
- ⑤ 塚本精一、藤井輝之、大山廣太郎、下澤東吾、小比類巻生、石渡信一、福田紀男 「Yellow Cameleon-Nano140 融合  $\alpha$ -actinin を用いた幼若心筋細胞におけるサルコメア動態と局所  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の同時観測」生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」生理学研究所（明大寺地区） 2017 年 9 月 15 日
- ⑥ 大山廣太郎、新谷正嶺、塚本精一、小比類巻生、下澤東吾、鈴木団、石渡信一、福田紀男「サルコメア収縮の蛍光イメージングと光操作技術の開発」精神・神経疾患研究開発費 「ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」平成 29 年度研究班会議 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター教育研修棟 ユニバーサルホール 2017 年 12 月 5 日
- ⑦ 小比類巻生、大山廣太郎、下澤東吾、石渡信一、福田紀男 “マウス心筋における単一サルコメア動態の *in vivo* ナノ解析” 第 95 回日本生理学会大会, サポート高松（香川県高松市）, 2018 年 3 月 30 日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小比類巻生

(KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA, Fuyu)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40548905

### (2)連携研究者

福田 紀男 (FUKUDA, Norio)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30301534

大山 廣太郎 (OYAMA, Kotaro)

東京慈恵会医科大学・医学部・訪問研究員

JST さきがけ

研究者番号：70632131

下澤 東吾 (SHIMOZAWA, Togo)

東京大学・理学部技術部・技術専門職員

研究者番号：00386608